

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MDOC a jeho vliv na iniciaci aterogenního procesu u
potkaního modelu diabetu mellitu

MDOC and its effects on atherogenic process in diabetic
rats.

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.
Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Hradec Králové 2008

Hana Přidalová

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem zadanou diplomovou práci zpracovala sama s přispěním vedoucího práce a používala jsem pouze literaturu a zdroje, které jsou uvedeny v seznamu použité literatury a řádně citovány. Dále prohlašuji, že nemám námitek proti půjčování nebo zveřejňování mé diplomové práce nebo jejích částí se souhlasem katedry.

Datum: 5. 5. 2008

.....
podpis diplomanta

Poděkování

Dovoluji si poděkovat PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, poskytnuté rady a za veškeré konzultace při práci v laboratoři.

ABSTRAKT

Diabetes mellitus je doživotní, avšak léčitelná choroba. Je to chronické etiopatogeneticky heterogenní onemocnění, jehož společným rysem je hyperglykémie a diabetická dyslipoproteinémie. Dietní vláknina také působí na metabolismus sacharidů, přičemž se uplatní vliv vlákniny zpomalením pasáže, inaktivací amylasy, přísun vlákniny také ovlivní výdej hormonů GIT. Pektin brzdí absorpci sacharidů z tenkého střeva do krve, čímž upravuje kolísání krevního cukru. Vláknina reguluje sekreci inzulínu tím, že zpomaluje střevní absorpci cukrů. MDOC neboli oxidovaná celulóza je anhydroglukuronová kyselina, která vzniká oxidací primární hydroxylové skupiny vázané na 6. uhlíkuβ -D-glukopyranózy. Tato substance patří do skupiny rozpustných vláknin.

Cílem této diplomové práce bylo ověřit potenciální antidiabetické a protizánětlivé účinky MDOC na experimentálním zvířecím modelu, kterým byl hereditární hypertriglyceridémický potkan (HHTg).

Samci hereditárního hypertriglyceridémického potkana byli rozděleni do 2 skupin. Kontrolní skupina potkanů byla krmena vysokofruktózovou dietou (standardní laboratorní dieta s přidavkem sacharózy – 70 %) s cílem navodit inzulínovou rezistenci. U MDOC skupiny zvířata obdržela stejnou dietu s přidavkem 5% MDOC. Dále byla provedena biochemická a imunohistochemická analýza exprese adhezních molekul.

Výsledky biochemické analýzy prokázaly pozitivní vliv podávané MDOC na hladiny TAG. Hladiny celkového cholesterolu a glukózy nebyly podáváním MDO ovlivněny. Expresi adhezních molekul ICAM-1 a VCAM-1, které reflektují rozvoj endoteliální dysfunkce byla překvapivě velmi slabá již u neléčených HHTg potkanů. Podávání MDOC navíc nijak tuto expresi neovlivnilo.

Závěrem lze tedy konstatovat, že jsme neprokázali antidiabetické a protizánětlivé účinky u HHTg potkanů coby modelu diabetu mellitu typu II.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is lifelong, however curable illness. It is chronic etiopathogenic heterogeneous disorder. It is characterized by hyperglycemia and diabetic dyslipidemia. Digestive fibre also affects metabolism of carbohydrates whereas it applies influence of fibre on slowing down the way through, inactivation of amylase also supply of fibre has influence on release of GIT hormones. Pectin slow down absorption of sugars from small intestine into the blood whereby it regulates blood sugar fluctuation. Fibre regulates secretion of insulin by slowing down intestinal absorption of sugars. MDOC alias oxidizing cellulose is anhydride glucuronic acid which is engendering by oxidation of primary hydroxide blocked on 6. carbon of β -D-Glucans. This substance is belonging into the group of soluble fibres.

The purpose of this diploma thesis was to test potential anti-diabetes and anti-inflammatory effects of MDOC on experimental animals, who were the hereditary hypertriglyceridemic rats (HHTg).

Rat males of hereditary hypertriglyceridemic kind were divided into two groups. First group was fed with high-fructose diet (standard diet with addition of 70% of sucrose) with the aim to induce the insulin resistance. Second group (MDOC) had same diet supplemented with 5% of MDOC. Biochemical analysis and the expression of cell adhesion molecules by means of immunohistochemistry were performed.

Results of biochemical analyses showed positive effect of MDOC on TAG levels. However levels of total cholesterol and glucose were not affected by the administration of the MDOC. The expression of cell adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 which are markers of endothelial dysfunction was surprisingly weak even in untreated HHTg rats. MDOC treatment did not change this the expression of VCAM-1 and ICAM-1 in aortic endothelium.

In conclusion, we did not demonstrated antidiabetic and antiinflammatory effects of MDOC in HHTg rats, animal model of type II diabetes mellitus.

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|-----------------|---|
| ACE | angiotenzin konvertující enzym |
| CAM | cell adhesion molecules, buněčné adhezivní molekuly |
| CH ₄ | methan |
| CRP | C – reaktivní protein |
| DLP | diabetická dyslipidémie |
| EDGF | endothelium-derived growth factor, růstový faktor produkovaný endotelem |
| HDL | high density lipoproteins, lipoproteiny o vysoké hustotě |
| HHTg | hereditární hypertriglyceridémický potkan |
| HMG-CoA | 3-hydroxyl-3-methyl-glutaryl koenzym A |
| ICAM-1 | intercellular cell adhesion molekule-1, adhezní molekula |
| IDL | intermediate density lipoproteins, lipoproteiny o střední hustotě |
| IGF – 1 | inzulinu podobný růstový faktor |
| LDL | low density lipoproteins, lipoproteiny o nízké hustotě |
| MAdCAM-1 | mucosal addressin cell adhesive molekule-1, adhezní molekula |
| MODC | modifikovaná oxidovaná celulóza |
| NF-κB | nukleární faktor kappa B |
| NO | oxid dusnatý |
| PAF | faktor aktivující krevní destičky |
| PAI-1 | inhibitor aktivátoru plazminogenu |
| PDGF | platelet-derived growth factor, destičkový růstový faktor |
| PECAM-1 | platelet endothelial cell adhesion molecule-1, adhezní molekula |
| TAG | triacylglyceroly |
| t-PA | tkáňový aktivátor plazminogenu |
| VCAM-1 | vascular cell adhesion molecule-1, adhezní molekula |
| VLDL | very low density lipoproteins, lipoproteiny o velmi nízké hustotě |

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| ABSTRAKT | 4 |
| ABSTRACT..... | 5 |
| SEZNAM ZKRATEK | 5 |
| 1. ÚVOD..... | 9 |
| 2. TEORETICKÁ ČÁST..... | 11 |
| 2.1 MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV | 12 |
| 2.2 ENDOTELIÁLNÍ DYSFUNKCE | 13 |
| 2.2.1 Funkce cévního endotelu | 13 |
| 2.2.2 Aktivace endotelu a endoteliální dysfunkce | 15 |
| 2.2.3 Možnosti detekce endoteliální dysfunkce..... | 15 |
| 2.2.4 Léčba endoteliální dysfunkce | 16 |
| 2.3 DIABETES MELLITUS | 18 |
| 2.3.1 Akutní komplikace..... | 18 |
| 2.3.2 Chronické komplikace | 19 |
| 2.3.2.1 Diabetická mikroangopatie..... | 19 |
| 2.3.2.2 Diabetická makroangiopatie..... | 21 |
| 2.4 INZULINOVÁ REZISTENCE - DYSLIPOPROTEINÉMIE..... | 23 |
| 2.4.1 Diabetická dyslipidémie (DLP) u diabetu 1. typu | 23 |
| 2.4.2 Diabetická dyslipidemie u diabetu 2. typu..... | 25 |
| 2.5 DIETNÍ VLÁKNINA A JEJÍ VLIVY NA LIDSKÝ ORGANISMUS | 26 |
| 2.5.1 Klasifikace vlákniny | 26 |
| 2.5.2 Jednotlivé typy dietní vlákniny..... | 26 |
| 2.5.3 Význam vlákniny | 28 |
| 2.5.4 MODC – „oxidovaná celulóza“..... | 29 |
| 2.6 SUPERRODINA IMUNOGLUBULINU..... | 30 |
| 2.6.1 Fyziologická funkce CAM..... | 30 |
| 2.6.2 Regulace exprese endoteliálních CAM..... | 32 |
| 2.7 PRAŽŠTÍ HEREDITÁLNĚ HYPERTRIGLYCERIDEMIČTÍ POTKANI | 32 |
| 3. PRAKTICKÁ ČÁST | 34 |
| 3.1 CÍL PRÁCE | 35 |
| 3.2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 36 |
| 3.2.1 Zvířata a předepsaná dieta | 36 |

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| 3.2.2 Biochemická analýza | 36 |
| 3.2.3 Imunohistochemie..... | 36 |
| 3.2.4 Statistická analýza..... | 39 |
| 4.VÝSLEDKY | 40 |
| 4.1 BIOCHEMICKÁ ANALÝZA | 41 |
| 4.2 IMUNOHISTOCHEMICKÁ ANALÝZA | 43 |
| 5. DISKUZE | 47 |
| 6. ZÁVĚR | 51 |
| 7. LITERATURA..... | 53 |

1. ÚVOD

Diabetes mellitus, je chronické, metabolické onemocnění postihující obě pohlaví, všechny věkové skupiny, rasy a etnika. Nejstarší zmínky o diabetu byly objeveny v Ebersově papyru, jehož stáří je odhadováno na 1500 let. Popis diabetu nalézáme ve spisech starověkých, středověkých i novověkých lékařů, ale téměř vždy velice nepřesný. Teprve v roce 1889 bylo objeveno hlavní sídlo poruchy – pankreas. Před objevem inzulínu byli pacienti s diabetem léčeni různými dietami a úmrtnost byla téměř stoprocentní. Až první extrakce této látky v roce 1920 umožnila relativně vyrovnaný souboj s touto nemocí a zajistila postiženým alespoň „podmíněné“, zdraví.

Cílem této diplomové práce bylo ověřit potenciální antidiabetické a protizánětlivé účinky MDOC na experimentálním zvířecím modelu, kterým byl hereditární hypertriglyceridémický potkan (HHTg).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV

Mezi hlavní funkce cév patří rozvod krve k orgánům, řídí množství krve v orgánech a tkáních, také pulzní proud krve ze srdce mění na plynulé proudění (1).

Stavba cév (obr. 1):

❖ Tunica intima

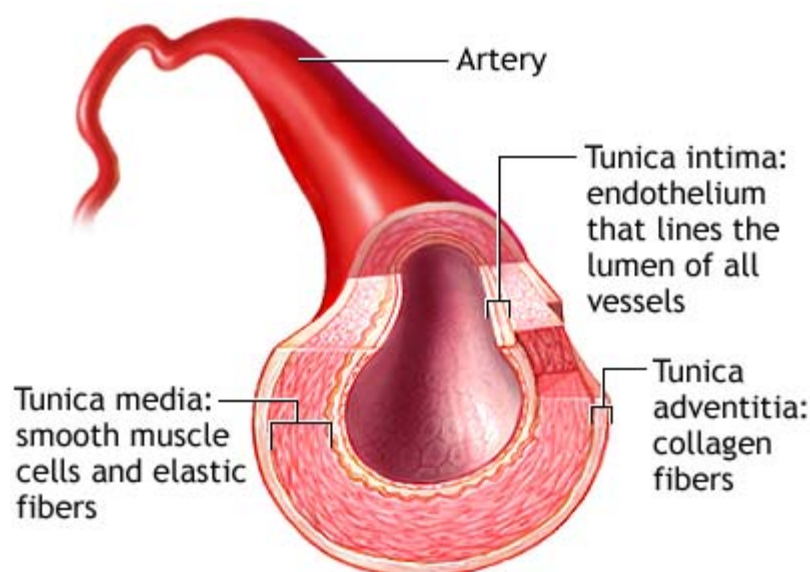
- endotelové buňky (dlaždicový epitel, na bazální lamině)
 - mezenchymální původ
 - zonulae occludentes, dezmosomy, nexy
 - intermed. fil., mikrofilamenta – kontrakce
 - Weibel-Paladeho tělíska (f. VIII - vWF)
 - receptory (adrenergní, histaminové, ADH)
 - syntéza vazoaktivních látek (NO, PG)
- subendoteliální vazivo (řídke pojivo, něco hladkých svalových buněk)
- lamina elastica interna (tvořena elastinem)

❖ Tunica media

- hladké svalové bb. (spirálovitě)
- elastická a kolagenní vlákna (typ III)
- lamina elastica externa (jen u silnějších artérií)

❖ Tunica adventitia

- fibroblasty
- kolagenní vazivo (typ I)
- elastická vlákna
- vasa vasorum
- nervové zásobení

Obrázek 1. Řez cévou

Zdroj: National Library of Medicine [online]

2.2 ENDOTELIÁLNÍ DYSFUNKCE

Endoteliální dysfunkce je způsobena řadou rizikových faktorů jako jsou hypertenze, hyperlipoproteinémie, diabetes i kouření svým chronickým působením poškozuje fyziologické funkce endotelu. Endoteliální dysfunkcí rozumíme lokalizované či generalizované postižení endotelu charakterizované zvýšením propustnosti cévní stěny a vznikem nerovnováhy mezi vazoaktivními a hemokoagulačními mechanismy. Endoteliální dysfunkce hraje důležitou roli v patogenezi cévní aterosklerózy, arteriální hypertenze, diabetu nebo srdečního selhání. Zlepšení poškozené funkce endotelu úpravou životosprávy a vhodnou léčbou může zabránit vzniku a progresi aterosklerózy a jejích komplikací (2).

2.2.1 Funkce cévního endotelu

Endotel je největším orgánem v lidském těle, je tvořen jednou vrstvou specializovaných buněk, které mají řadu regulačních funkcí.

1. Regulace cévního tonu

Endotel udržuje cévní tonus produkcí látek s vazodilatačními a vazokonstrikčními vlastnostmi. Hlavním vazodilatačním působkem je oxid dusnatý (EDRF/NO), dalšími

vazodilatačními faktory jsou např. prostacyklin (PGI₂) a bradykinin. Nejsilnějším vazokonstrikčním faktorem je endotelin-1, dalšími důležitými látkami jsou angiotensin II, acetylcholin nebo tromboxan A₂. Poškození funkce endotelu se projevuje sníženou tvorbou oxidu dusnatého, zvýšenou produkcí vazokonstrikčních faktorů a narušením vazorelaxačních schopností endotelu.

2. Ovlivnění struktury cévní stěny

Endotel ovlivňuje strukturu cévní stěny produkcí látek s růst stimulujícími a růst inhibujícími účinky. Zvýšené mechanické napětí cévní stěny vede k produkci růstových faktorů jako např. PDGF (růstový faktor tvořený destičkami) a IGF-1 (inzulinu podobný růstový faktor). Také endotelin-1 a angiotensin II mají mitogenní účinek na hladké svalové buňky a endotel. Mezi látky inhibující proliferaci buněk cévní stěny patří EDRF/NO, prostacyklin nebo TGF- β (3).

3. Antitrombotické a fibrinolytické vlastnosti

Intaktní endotel je dokonalým nesmáčivým povrchem, který udržuje rovnováhu mezi faktory regulujícími trombotické a fibrinolytické procesy. Antikoagulační aktivita spočívá ve vytváření bariéry mezi cirkulujícími koagulačními faktory a tkáňovým faktorem a v produkci antikoagulačně působícího heparan sulfátu a trombomodulinu (působícím prostřednictvím aktivace proteinu C). V regulaci fibrinolýzy se endotel účastní tvorbou plazminogenového aktivátoru (tPA) a inhibitorů plazminogenových aktivátorů (PAI-1,2). Endotel produkuje také řadu koagulačních faktorů (faktory V, VII, tkáňový faktor, kininogen) a protrombogenní von Willebrandův faktor.

4. Interakce s buňkami v krevním oběhu

Endotel na svém povrchu exprimuje adhezivní molekuly, které zajišťují interakci s buňkami v krevním oběhu. Za fyziologických okolností je na povrchu endotelu jen malé množství adhezivních molekul. Při aktivaci endotelu je zvýšena exprese adhezivních molekul na povrchu endotelu a leukocytů (E-selektinu, imunoglobulinových adhezivních molekul, integrinů), která usnadňuje adhezi a průnik leukocytů do cévní stěny (4).

5. Regulace permeability

Endotel vytváří selektivní bariéru bránící průniku škodlivých látek do cévní stěny. Za patologických situací, při poškození endotelu nebo jeho aktivaci zánětlivými působky či

ischémií, se zvyšuje propustnost endotelu pro aterogenní lipidy a monocyty, dochází k jejich akumulaci subendoteliálně a k iniciaci pochodů vedoucích k ateroskleróze (5).

2.2.2 Aktivace endotelu a endoteliální dysfunkce

Endotel neustále odpovídá na řadu lokálních a systémových podnětů. Aktivace endotelu těmito podněty vede k různým typům odpovědi - ke změně permeability, vazospastickým reakcím, porušení hemostatických mechanismů, uvolnění růstových faktorů. Aktivace endotelu může být na rozdíl od endoteliální dysfunkce přechodnou krátkodobou epizodou, která provází např. virovou infekci, nebo krátkodobou expozici aktivačním faktorům (6).

Rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění jako jsou hypertenze, hyperlipidémie, diabetes, kouření, hyperhomocysteinémie nebo nedostatek estrogenů svým chronickým působením poškozují endoteliální funkce vedou ke vzniku endoteliální dysfunkce. Endoteliální dysfunkcí rozumíme lokalizované či generalizované poškození endotelu charakterizované zvýšením propustnosti cévní stěny a vznikem nerovnováhy mezi faktory vazorelaxačními a vazokonstrikčními, prokoagulačními a antikoagulačními, růst stimulačními a růst inhibujícími. Výsledkem je proaterogenní účinek s převahou vazokonstrikčních, protrombotických a proliferačních pochodů.

V současné době je známo, že velká většina kardiovaskulárních onemocnění je spojena s poruchou funkce endotelu (2).

Endoteliální dysfunkce a diabetes mellitus

Hyperglykémie je spojena s glykosylací lipoproteinů, glykací bílkovin a zvýšenou permeabilitou endotelu pro aterogenní lipidy. Hyperglykémie aktivuje endotel k expresi adhezivních molekul, dochází k průniku monocytů přes endotel. Narušena je také produkce vazodilatačních a koagulačních působků (snížená syntéza prostacyklinu, nižší dostupnost NO, zvýšená sekrece von Willebrandova faktoru a PAI-1) (3).

2.2.3 Možnosti detekce endoteliální dysfunkce

V praxi se nejčastěji k průkazu endoteliální dysfunkce používají 3 metody. První z nich je sledování cévní reaktivity, u které se používá průkaz narušené vazorelaxační

schopnosti cév na farmakologické podněty (např. průkaz patologické vazokonstrikce po podání acetylcholinu) nebo nefarmakologické testy (např. dilatace na předloktí po zvýšení průtoku). Výsledek se hodnotí invazivními metodami (angiograficky) nebo neinvazivně pomocí ultrasonografie. Další možností je laboratorní stanovení látek produkovaných endotelem. Stanovují se např. hladiny endotelinu-1, adhezivních molekul (E a P-selektin, ICAM-1, VCAM-1), hemokoagulačních faktorů (PAI, t-PA, vWf) a zánětlivých mediátorů (CRP). Poslední metodou jsou dynamické testy sledující osud radioizotopem značeného substrátu např. L-argininu se v praxi uplatňují méně (7).

2.2.4 Léčba endoteliální dysfunkce

Léčba endoteliální dysfunkce může předejít rozvoji aterosklerózy zabráněním přechodu funkčních změn ve změny strukturální a umožňuje stabilizovat již vyvinuté aterosklerotické léze. Léčba onemocnění spojených s endoteliální dysfunkcí by měla směřovat k obnovení fyziologických funkcí endotelu eliminací rizikových faktorů a není-li tato cesta možná, pak vhodnou farmakologickou léčbou stimulující vazodilatační, antiadhezivní a antiagregační vlastnosti endotelu (8).

Nefarmakologické možnosti léčby endoteliální dysfunkce

Nejjednodušším opatřením je odstranění působení rizikových faktorů úpravou životosprávy. Vyloučení vlivu kouření vede do několika měsíců k normalizaci endoteliálních funkcí. Zlepšení endoteliální dysfunkce bylo dosaženo úpravou glykémie u diabetiků, fyzickým tréninkem u nemocných se srdečním selháním, změnou dietních návyků u nemocných s hyperlipoproteinémií nebo dietní suplementací L-argininu.

Farmakoterapie endoteliální dysfunkce

A. Hypolipidemická léčba. K úpravě endoteliální dysfunkce byla zkoušena různá hypolipidemika, osvědčily se však především inhibitory HMG-CoA reduktázy - statiny. Statiny snižují LDL a oxidovaný LDL cholesterol, stimulují produkci EDRF/NO, vedou k obnově endotelem zprostředkované vazodilatace. Léčba statiny je spojena s významným poklesem výskytu kardiovaskulárních příhod, na kterém se spíše než regrese aterosklerózy podílí úprava endoteliální dysfunkce (9).

B. Inhibitory ACE - ACE inhibitory snižují konverzi angiotenzinu I na angiotenzin II a současně blokují odbourávání bradykininu. Snížení hladiny

angiotenzinu II vede komplexním mechanismem k vazodilataci, snížené migraci a proliferaci hladkých svalových buněk, zpomalení inaktivace NO a poklesem aktivace PAI-1 k úpravě fibrinolýzy. Zpomalení degradace bradykininu vede k vazodilataci stimulací NO syntázy. Klinický význam působení inhibitorů ACE na endotel potvrdily např. výsledky studie TREND, která u nemocných s koronární aterosklerózou a zvýšením LDL cholesterolu prokázala úpravu endoteliální dysfunkce při 6 měsíční léčbě quinaprilem (10).

C. Antioxidační látky. Předpokládaným mechanismem účinku antioxidačních látek (vitamin E, kys. askorbová, beta-karoten) na endoteliální dysfunkci je snížení oxidačního stresu vedoucí k nižší inaktivaci NO a stimulaci syntézy prostacyklinu. Výsledky studií zatím nejsou jednoznačné (11).

D. Estrogeny - Estrogeny zvyšují syntézu NO a prostacyklinu, inhibují syntézu tromboxynu A₂ a endotelinu-1, snižují hladinu LDL cholesterolu a mají antioxidační účinky. Estrogeny snižují hladinu fibrinogenu, ale současně dochází i k poklesu antitrombinu III a zvýšení koagulačních faktorů VII a X. Řada studií prokázala účinnost estrogenové substituce v menopauze na úpravu endoteliální dysfunkce a pokles kardiovaskulární mortality (12).

E. Blokátory kalciových kanálů. Dalšími látkami ovlivňujícími endoteliální funkce jsou blokátory kalciových kanálů. Amlodipin ovlivňuje endotel stimulací produkce bradykininu a inhibicí oxidace lipidů volnými radikály a tvorby pěnových buněk.

Závěrem je nutno říci, že endotel je endokrinní a parakrinní orgán s řadou regulačních funkcí, jehož zdraví je nezbytné pro fyziologickou funkci cévního systému. Působení rizikových faktorů jako jsou hypertenze, hyperlipidémie, diabetes, kouření na endotel poškozuje jeho funkce a způsobuje vznik endoteliální dysfunkce. Úprava poškozených funkcí endotelu úpravou životosprávy a vhodnou farmakologickou léčbou je důležitým terapeutickým cílem při léčbě onemocnění spojených s endoteliální dysfunkcí (13).

2.3 DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus je doživotní, avšak léčitelná choroba. Je to chronické etiopatogeneticky heterogenní onemocnění, jehož společným rysem je hyperglykémie, která má různé klinické formy. Každá z nich má rozdílnou etiologii, klinické projevy a průběh. Společná je komplexní porucha metabolismu s hyperglykemií.

U většiny diabetiků se setkáváme s řadou komplikací, které jsou pro pacienty velmi nebezpečné. Tyto komplikace dělíme na akutní a chronické. První skupina zahrnuje hypoglykemické stavy a hyperglykemické kóma, do druhé pak řadíme postižení cév, mikroangiopatie a makroangiopatie, vedoucí k postižení tkání a orgánovému selhání (14).

2.3.1 Akutní komplikace

Mezi akutní komplikace patří *ketoacidotické koma*. Vzniká u diabetiků 1. typu, kteří si nepodávají inzulín. V těle se hromadí ketolátky, dochází k okyselení krve, tekutiny z těla se ztrácí při nadměrném močení. Nemocný má různě hlubokou poruchou vědomí, usilovně dýchá, z dechu je cítit aceton, jehož zápach se nejčastěji přirovnává k nezralým jablkům.

Hyperglykemické hyperosmolární koma je závažnou akutní komplikací, která se objevuje u starších diabetiků 2. typu. Vyvolávajícím momentem bývá infekce, nejčastěji zápal plic nebo infekce močových cest. Dochází k těžkému odvodnění organismu, hladina cukru v krvi je velmi vysoká. Tato komplikace se nevyskytuje často, ale má poměrně vysokou úmrtnost (15).

Vzácné je *laktacidotické koma*, které bývalo u nemocných s DM 2. typu komplikací léčby dnes již nepoužívanými přípravky (fenformin nebo buformin). K tomuto stavu může v současnosti dojít, pokud nemocný drží přísnou redukční dietu bez dohledu a rad lékaře nebo nadměrně konzumuje alkohol při současné léčbě cukrovky bigvanidy (metformin).

Hypoglykemické koma je vážnou komplikací, která nastává při předávkování inzulínem nebo léky, které zvyšují vylučování inzulínu z beta buněk, nebo při vyšší spotřebě cukru v těle aniž by byla snížena dávka inzulínu (po sportovním zatížení atd.). V důsledku poklesu hladiny cukru v krvi a následně i v mozku dojde nejprve k

vyplavení hormonů, které se snaží zvýšit hladinu cukru, a posléze k poruše a ztrátě vědomí. Nejčastější projevy jsou pocení, třes, hlad, nervozita, neklid, poruchy soustředění (16).

2.3.2 Chronické komplikace

A. specifické

- komplikace vyskytující se jen u nemocných s diabetem jde především o mikrovaskulární komplikace (postihující malé cévy)
- postižení nervů (diabetická polyneuropatie periferní i autonomní)- nutné pravidelné neurologické vyšetření
- postižení sítnice (diabetická retinopatie)- nutné pravidelné vyšetření očního pozadí
- postižení ledvin (diabetická nefropatie)- nutná pravidelná kontrola mikroalbuminurie (albumín v moči)
- postižení malých cév (mikroangiopatie) (17).

B. nespecifické

- choroby, které se vyskytují i u nediabetiků, ale u diabetiků je jejich výskyt častější nebo se objevují dříve jde především o makrovaskulární komplikace postihující především pacienty s diabetem II. typu
- onemocnění srdce a cév - je nutná kontrola váhy, krevního tlaku, hladiny krevních lipidů, cévní vyšetření (cév dolních končetin, krčních tepen, koronárních cév)
- infekce.

2.3.2.1 Diabetická mikroangopatie

Diabetická retinopatie

Postižení sítnicových cév u diabetu je projevem diabetické mikroangiopatie. Klinický obraz je podmíněn morfologickými změnami kapilár sítnice, což je oblast extrémně citlivá na hypoxii. Pacient uvádí obvykle poruchu vidění, jejíž stupeň závisí na charakteru změn. Zraková neostrost (rozmazané vidění) může mít kolísavou intenzitu, která je způsobena nepravidelným bobtnáním čočky při rozkolísaných

glykémii. Při posuzování zrakových poruch je nezbytná spolupráce s oftalmologem, který pacienta sleduje při pravidelných vyšetřeních minimálně jednou ročně. Současně je zapotřebí věnovat se účinné léčbě arteriální hypertenze, která také urychluje rozvoj retinopatie. Hlavní příčina retinopatie je však dlouhodobě špatně kompenzovaná cukrovka, vysoký krevní tlak a vysoké hladiny tuků (18).

Diabetická retinopatie má tyto formy:

- a) neproliferativní počínající a středně pokročilá - vznik drobných výdutí na cévách- mikroaneurismata, která mohou prasknout, a vznikne krvácení;
- b) neproliferativní pokročilá - pokračující změny na cévách, dochází k změnám prokrvení sítnice ve smyslu hypoxie a buňky sítnice odumírají;
- c) proliferativní- nejzávažnější forma retinopatie, ke které dochází pokračujícím nedostatečným okysličováním sítnice. Tento stav vyvolává závažnou komplikaci - vznik druhotného zeleného zákalu.
- d) diabetická makulopatie - edém makuly-žluté skvrny, tedy místa nejostřejšího vidění.

Léčba diabetické retinopatie spočívá v podávání léků, které ovlivňují pevnost stěny cévní, upravují krevní tlak a hladiny tuků. Důležitý je dietetický režim. U pokročilé diabetické retinopatie se může zvolit léčba laserem (19).

Diabetická nefropatie

Její hlavní příčinou je dlouhodobě zvýšená glykémie. Prvním projevem diabetické nefropatie je nález bílkoviny v moči. Z počátku malé množství- mikroalbuminurie, později i větší množství-proteinurie. Diabetická nefropatie je zpravidla provázána i jinými komplikacemi diabetu, především postižením očí- retinopatie. Při diabetické nefropatii je často nutné upravit dietu, která ovšem není pro diabetiky dlouhodobě vhodná, protože vede k závažným poruchám výživy. Proto se většinou indikuje léčba dialýzou nebo transplantací ledvin.

Diabetická neuropatie

Diabetická neuropatie je charakterizována poškozením nervového systému v rozličných částech těla diabetika a její výskyt je poměrně častý u 1. i 2. typu diabetu. Toto poškození vzniká hromaděním sorbitolu a fruktózy v následku hyperglykémie, podílí se na ní také mikroangiopatické změny cév, které zásobují nervovou tkáň.

Klasické příznaky se liší podle typu postiženého nervstva. Poškození senzitivních nervů se projevuje mravenčením a svrběním, poruchami citlivosti a

snížením citlivosti na vnější smyslové podněty. Motorické poruchy a svalová atrofie poukazují na postižení motorických nervů. Při neuropatii nacházíme širokou škálu postižení, od téměř bezvýznamných komplikací až k závažným příhodám, které mají za následek invalidizaci či smrt pacienta (20).

Léčba neuropatických potíží je velmi svízelná, při bolestivých formách bývají navíc běžná analgetika často bez efektu. Často je třeba zavedení intenzivního léčebného programu při současné hospitalizaci. O nutnosti dlouhodobé dobré kompenzace cukrovky, která je tím nejdůležitějším faktorem úspěšnosti léčby, snad není již třeba znovu mluvit.

2.3.2.2 *Diabetická makroangiopatie*

Postižení větších cév při diabetu je projevem akcelerované aterosklerózy. Jedná se o komplexní postižení cévní stěny, které je důsledkem abnormalit v metabolismu lipidů akcentovaných při diabetu sacharidovou poruchou a které má odezvu i v koagulačním resp. fibrinolytickém systému. Penetrace makrofágů obsahujících lipidy do cévní stěny, přeměna na pěnové buňky a tvorba fibrózních a posléze i ateromových plátů jsou podkladem morfologických odchylek.

Na rozdíl od diabetické mikroangiopatie, která je přímým důsledkem základní poruchy při diabetu, je postižení větších cév složitější, protože se při něm kombinují různé faktory. V klinickém obraze převládají projevy postižení koronárních cév (ischemická choroba srdeční), mozkových cév (cévní mozkové příhody) nebo končetinových cév (ischemická choroba dolních končetin), i když ateroskleróza je lokalizována i na jiných částech cévního řečiště.

Opatření týkající se vlastních cév jsou stejná jako u pacientů bez diabetu. Jde o léčbu arteriální hypertenze, poruch lipidového metabolismu, použití antiagregačních a vazodilatačních farmak. Součástí opatření je vždy i režimová a dietní léčba, které mají důležitou úlohu v prevenci cévních změn (18).

Diabetická noha

Samostatnou pozornost u diabetiků vyžaduje péče o dolní končetiny. Pojem diabetická noha se používá při různém postižení nohou diabetika. Příčiny jsou jednak vaskulární, jednak neuropatické, ale nejčastěji smíšené (kolem 70 %). Existuje několik znaků, podle nichž rozeznáváme neuropatickou a neuroischemickou diabetickou nohu.

- a) Neuropatická noha je charakteristická zvýšeným průtokem krve, teplejší při palpaci, defektem v místě zvýšeného tlaku, dále taky minimální bolestí při otlacích a přítomnost pulsu.
- b) Pro neuroischemickou nohu je typické snížení průtok krve, chladnější při palpaci, nevyskytuje se bolestivost v místě otlaku a chybí puls (17).

Klasifikace diabetické nohy

Nejvíce užívaný systém klasifikace závažnosti diabetické nohy je Wagnerova klasifikace. Dle tohoto systému lze vypracovat obecný algoritmus sledování a léčby pacientů s diabetickou nohou.

Stupeň 0 – lze jej klasifikovat jako rizikovou nohu. To znamená, že pacient s tímto typem nohy má vysokou pravděpodobnost vzniku diabetického vředu.

Stupeň 1 – povrchové vředy, které nezasahují pod dermis, jsou bolestivé a rychle se infikují. Rovněž je volen konzervativní postup při chirurgickém čištění rány, protože tkáň pod defektem je hypoxická, nedochází k hojení, ale naopak k zvětšení defektu. Zde je nutné kvalitní angiologické vyšetření a nezhledka chirurgická intervence. Neuropatické vředy vznikají v místě zvýšeného tlaku, nebo pod nášlapkem. Častou příčinou rovněž je popálení a nesprávná péče o vlastní končetiny (stříhání nehtů a nášlapků). Nejúčinnější léčbou tohoto stadia je odlehčení končetiny a odstranění nášlapků. Pokud se nášlapky tvoří dál, je to známka že pacient neodlehčuje končetinu, že stále chodí.

Stupeň 2 – jedná se o hluboké infikované vředy, s častým postižením šlachy. Vřed zasahuje pod dermis do tkání nohy. Chirurgické odstranění nekrotických hmot a drénování abscesů musí být provedeno co nejdříve. U tohoto stadia je plně indikovaná antibiotická léčba. Tento stupeň snadno přejde do stupně 3 a při zanedbání včasné léčby může skončit amputací.

Stupeň 3 – noha je červená, oteklá, teplá, jsou známky flegmony. Často jsou přítomny abscesy v hlubokých tkáních nohy. Nezhledka bývá přítomná osteomyelitis. Toto stadium představuje přímé ohrožení nohy amputací. Chirurgický výkon, často v celkové anestezii (drenáž hlubokých abscesů, drobná amputace, vynětí zanícené kosti, někdy i primární amputace celé nohy). Poté následuje parenterální léčba antibiotiky.

Stupeň 4 – zahrnuje gangrénu přední části nohy, která vyžaduje amputaci. Ischemická gangréna prstů může vzniknout na podkladě infekce měkkých tkání. Snaha všech lékařů udělat co nejmenší amputační výkon.

Stupeň 5 – jedná se o gangrénu celé nohy, kde je indikována amputace. Zvláště u ischemických končetin je častá amputace nad kolenem. Za rizikové faktory amputací jsou považovány: předchozí amputace, deformity nohy, ztráta citlivosti nohy při neuropatii a cévní insuficience. Těsně po amputaci je mortalita diabetiků 23% a pouze 61 % přežije 3 roky. Více než 60% pacientů prodělá amputaci druhé nohy v průběhu 4 let po ztrátě končetiny (14).

Nehojící se vřed

U určité skupiny pacientů nedochází k hojení diabetického vředu. Tento stav je označován jako nehojící se vřed, nebo chronický vřed a perzistuje po mnoho měsíců a někdy i let. Jednou z příčin u ambulantních pacientů je nedostatečné compliance. Nadměrná chůze, nevhodné boty, krátká doba nošení speciální obuvi a tudíž nedostatečné odlehčení končetiny. Na zpomaleném hojení se rovněž podílí infekce, často plísňová, chronická dekompenzace diabetu a otok. U pacientů na lůžku je nejčastější příčinou nehojícího se vředu ischemie. 46% těchto vředů končilo amputací. Příčinou zpomaleného hojení vředu na lůžku však může být již zmiňovaná dekompenzace diabetu, infekce, renální insuficience, ale i podvýživa.

2.4 INZULINOVÁ REZISTENCE - DYSLIPOPROTEINÉMIE

2.4.1 Diabetická dyslipidémie (DLP) u diabetu 1. typu

DLP u nemocných s diabetem mellitus 1. typu je důsledkem nedostatku inzulínu. Proto není divu, že podle posledních výsledků většiny studií, mají diabetici 1. typu se zavedou inzulínovou léčbou a optimální kontrolou glykémie normální hodnoty plazmatických lipidů a lipoproteinů. Je však třeba tyto výsledky kriticky revidovat ve světle „normy“ pro diabetiky. Populace nemocných s DM představuje extrémně rizikovou skupinu, pro které jsou cílové hodnoty cholesterolu, triglyceridů a dalších

lipoproteidů stanoveny nej přísněji. Cílová koncentrace cholesterolu u nemocných s DM je však 5 mmol/l a méně (16).

U pacientů se špatně kontrolovaným DM 1. typu je nejobvyklejší odchylkou lipidového metabolismu střední až těžká hypertriglyceridémie. Především se jedná o zvýšení intermediálních lipoproteinů IDL, LDL-cholesterolu a snížení HDL cholesterolu. Tyto odchylky odpovídají podle klasifikace EAS izolované hypertriglyceridémie, nebo smíšené hyperlipoproteinémie. Izolovanou hypercholesterolémií u nemocných s diabetem mellitus 1. typu prakticky nenacházíme (15).

Podkladem základní změny v lipidovém a lipoproteinovém spektru, hypertriglyceridémie, je především nedostatek inzulinu s následnou deficiencí lipoproteinové lipázy (LPL) a zvýšená produkce lipoproteinů bohatých na triglyceridy (VLDL) v játrech. Důsledkem snížené aktivity LPL je zhoršení clearance lipoproteinových částic bohatých na triglyceridy. Při velkém deficitu inzulinu může být těžká hyperchylomikronémie podkladem pro vznik eruptivní xantomatózy nebo rizikem akutní pankreatitidy. Podání inzulinu vede během několika týdnů k normalizaci aktivity LPL. Jestliže je nemocný léčen inzulinem, hladina LPL není dokonce závislá na hyperglykémii.

Druhým důvodem hypertriglyceridémie je zvýšená sekrece lipoproteinů obsahujících polipoprotein B a vysoké množství triglyceridů (VLDL). Inzulin je důležitým inhibítozem lipolýzy v adipocytech. Jeho deficit je proto spojen se zvýšenou nabídkou volných mastných kyselin. Potom spolu se zvýšenou glykemií stimulem pro syntézu VLDL v játrech (21).

Další významnou zněnou u DM typu 1 je ovlivnění HDL. Důvodem nižších hladin HDL je pravděpodobně opět snížená aktivita LPL. U dobře kontrolovaných nemocných po podání inzulinu dochází po týdnech ke zvýšení a normalizaci HDL.

Vzestup LDL není u DM 1. typu uniformním nálezem. Diskutuje se opět o přímém vlivu inzulinu. Inzulin pravděpodobně zvyšuje katabolismus LDL na povrchu buněčných membrán. Přesto se většina autorů domnívá, že zlepšení hodnot LDL po terapii inzulinem je důsledkem snížení produkce LDL (z VLDL) než zvýšením jejich clearance.

Součástí LDL je i v posledních letech dále diskutovaný lipoproteid (a) (Lp(a)). Ten je považován za samostatný rizikový faktor předčasné aterogeneze nejméně ze dvou důvodů. Za prvé je navázán přímo v aterosklerotických lézích, ale tento protein kompetuje o plazminogenový receptor a zasahuje negativně do procesu fibrinolýzy.

Vztah Lp(a) ani jeho metabolismus u DM 1. typu není jednoznačně objasněn. Většina autorů však potvrzuje u diabetiků vyšší koncentrace tohoto faktoru. Podle některých autorů je zhoršení glykémie provázeno mírnou elevací plazmatické hladiny Lp(a).

Při diabetu 1. typu dochází ke změnám ve složení lipoproteinových částic. VLDL partikule mají zvýšený poměr volného cholesterolu k fosfolipidům, obsahují více triglyceridů a méně bílkovin. Intermediální částice (IDL) obsahují více fosfolipidů, mají vyšší poměr volného cholesterolu, ale proteiny jsou zde zastoupeny méně.

Hlavními determinanty závažnosti poruchy tukového metabolismu u DM 1. typu jsou špatná kompenzace diabetu, stupeň obezity, věk nemocného a rovněž přítomnost nefropatie (16).

2.4.2 Diabetická dyslipidemie u diabetu 2. typu

Diabetes mellitus 2. typu představuje velmi heterogenní onemocnění charakterizované inzulinovou rezistencí. Obezita se vyskytuje u 4/5 nemocných a je spolu s inzulinovou rezistencí predisponujícím faktorem pro rozvoj a manifestaci diabetu. Normoglykemie může přetrvávat dlouhou dobu, pokud jsou beta buňky schopny kompenzovat inzulinorezistenci.

Podobně jako u DM 1. typu je i u DM 2. typu podkladem DLP především zvýšená produkce VLDL v játrech a porušená clearance částic bohatých na triglyceridy v plazmě. Nadměrná produkce VLDL v játrech je důsledkem zvýšené nabídky volných mastných kyselin při zvýšené lipolýze v tukové tkáni, kterou způsobuje relativní nedostatek inzulinu. Nadměrná koncentrace VLDL pak blokuje metabolickou cestu odbourávání částic bohatých na triglyceridy.

Nejčastější lipidovou odchylkou je hypertriglyceridémie, která je diagnostikována u více než 50% nemocných. Dalšími charakteristickými nálezy pak jsou zvýšení IDL, snížení HDL-cholesterolu a zvýšený výskyt VLDL a vysoce

aterogenních LDL. Celková koncentrace LDL bývá zvýšená pouze u neléčených a po kompenzaci se zlepšuje. Koncentrace Lp(a) nejsou pravděpodobně u DM 2. typu zvýšeny. Snížení HDL o 20-30%, není vysvětlitelné pouze obezitou a často se zlepšuje po podání inzulínu.

Někteří autoři zdůrazňují význam postprandiální lipémie. U nemocných s normálními triglyceridy je prodloužená clearance chylomikronových částic. Zvýšení hladiny triglyceridů nalačno pak navíc koreluje s prodlouženým odbouráváním chylomikronových zbytků a je indikátorem závažnosti postprandiálního vzestupu lipoproteinů u nemocných s diabetem 2. typu. Mechanismus není jednoznačně objasněn (20).

2.5 DIETNÍ VLÁKNINA A JEJÍ VLIVY NA LIDSKÝ ORGANISMUS

2.5.1 Klasifikace vlákniny

Vlákninou rozumíme nestravitelné zbytky rostlinného původu. Tvoří ji heterogenní směs látek různého chemického složení (nejčastěji polysacharidy) a biologických účinků.

„Dietní vláknina“ zahrnuje nestravitelná residua rostlinného původu v lidské dietě a nejsou to výhradně jen složky membrán rostlinných buněk. V roce 2001 byla přijata a v současné době preferovaná definice dietní vlákniny určená Americkou asociací chemiků cereálií: „Dietní vláknina je tvořena požitelnou částí rostlinných nebo obdobných sacharidů, které jsou rezistentní k trávení a absorpci v lidském tenkém střevě s kompletní nebo částečnou fermentací v tlustém střevě.“ Dietní vláknina ovlivňuje fyziologické děje svým prokinetickým účinkem a vyvolává pozitivní změny hladin krevního cholesterolu a glukosy (22).

2.5.2 Jednotlivé typy dietní vlákniny

Lactulosa je nestravitelný disacharid s probiotickým účinkem. Stimuluje růst bifidogenní mikroflóry v tenkém střevě, čímž potlačuje hnilobné a stimuluje kvasné

procesy v tlustém střevě. Vyskytuje se v pasterovaném, sterilovaném či jinak tepelně ošetřeném mléce a mléčných výrobcích.

Celulosa je obsažena v ovoci a zelenině (1 - 2%), v obilovinách a luštěninách (2 - 4%). V pšeničné mouce její obsah činí jen 0,2 - 3% (podle stupně vymletí), ale v otrubách 30 - 35%. Celulosa je štěpena celulotickými enzymy zvanými celulázy, které však u člověka chybí.

Heterofruktany jsou syntetizovány jako rezervní látky mnoha vyšších rostlin i mikroorganismů. Přírodní fruktany se klasifikují na *inuliny* (v kořenech čekanky), *levany* (syntetizovány bakteriemi *Bacillus subtilis*) a *glukofruktany* (v pšenici, žitu).

Heteromanany jsou složeny z jednotek D-mannosy a na některé z nich je vázána α -D-galaktosa, pak se jedná o *galaktomannany* (např. guarová guma, která se získává jako mouka z endospermu semen luštěnin *Cyamopsis tetragonoloba*).

Hemicelulosy je společný název pro strukturní necelulosové polysacharidy buněčných stěn rostlin, které vyplňují prostor mezi celulosovými vlákny. Patří sem 2 hlavní skupiny polysacharidů: *heteroglukany* a *heteroxylany*. Heteroglukany jsou tvořeny xyloglukany a β -glukany. Strukturní xyloglukany jsou nerozpustné složky vlákniny. β -glukany se nacházejí v buněčných stěnách obilovin (ječmen, oves, pšenice), jsou zčásti rozpustnou, částečně nerozpustnou vlákninou potravy. Heteroxylany jsou zastoupeny v lodyhách rostlin, např. také v kukuřičných klasech a dřevní hmotě. Ve slupkách pšeničných zrn je obsaženo 64% heteroxylanů, zrna pšenice obsahují 1,4-2,1%, zrna rýže 7-8% heteroxylanů.

Pektiny se nacházejí v pletivech vyšších rostlin a jsou složkami všech druhů ovoce a zeleniny. Velké množství pektinu se nachází v jablkách, rybízu, angreštu, rajčatech a mrkvi, méně pak v třešních, višních a borůvkách. Základní struktura je tvořena lineárním řetězcem D-galakturonové kyseliny a jednotky galakturonové kyseliny jsou do různého stupně esterifikovány methanolem. Pektin ovlivňuje metabolismus glukosy a snižuje množství cholesterolu v krvi. Účinnější je pektin s vyšším obsahem methoxylových skupin (hrozny, broskve) (23).

2.5.3 Význam vlákniny

Dietní vláknina, která dosáhne tlustého střeva, podléhá fermentaci bakteriální flórou za vzniku krátkých mastných kyselin (SCFA- short chain fatty acids) – kyseliny octové, propionové a máselné za tvorby CO_2 , H_2 a CH_4 . Bakteriálním kvašením tak může být metabolizováno až 75% dietní vlákniny, která prochází tlustým střevem. Z dietní vlákniny vzniká kvašením v tlustém střevě ze 62% acetát, z 25% propionát a z 16% butyrát. Butyrát z dietní vlákniny hraje důležitou roli v prevenci poškození střevní sliznice například zánětem, metaplaziemi až rozvojem karcinomu tlustého střeva. Kyselina propionová v tlustém střevě má inhibiční účinek na jaterní 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-reduktasu, hlavní enzym při syntéze cholesterolu. Přídavkem vlákniny ke stravě bylo prokázáno snížení aktivity tohoto enzymu (24).

Kvašením pektinu dochází k nejvyšší produkci mastných kyselin s krátkými řetězci, menší produkce je pozorována u psyllia a methylcelulosy.

Preventivní význam dietní vlákniny proti vzniku kolorektálního karcinomu je potvrzen rozsáhlými epidemiologickými studiemi. Z metabolických a nutričních poruch se nedostatek vlákniny podílí na vzniku obezity, rozvoji diabetu II. typu a hyperlipidemii. V oblasti léčby diabetu a dyslipidemií se nejlépe uplatňuje rozpustná vláknina typu galaktomananů (guarová guma), která působí sníženou resorpcí živin a zejména tuků. Pektiny a guarová guma mají největší účinek na snížení plazmatického cholesterolu. Tento pozitivní vliv je vysvětlován vychytáváním žlučových kyselin a jejich vylučování stolicí čímž dochází ke zvýšené tvorbě žlučových kyselin z cholesterolu v játrech a k poklesu celkových zásob cholesterolu v organismu.

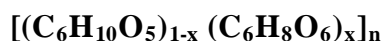
Dietní vláknina také působí na metabolismus sacharidů, přičemž se uplatní vliv vlákniny zpomalením pasáže, inaktivací amylasy, přísun vlákniny také ovlivní výdej hormonů GIT. Pektin brzdí absorpci sacharidů z tenkého střeva do krve, čímž upravuje kolísání krevního cukru. Vláknina reguluje sekreci inzulínu tím, že zpomaluje střevní absorpci cukrů. Je prokázáno, že při dietě s vysokým obsahem vlákniny se zvyšuje senzitivita na inzulín. Nadměrně dlouhodobá konzumace vlákniny, v denním množství nad 30g, způsobuje vazbu důležitých minerálních látek jako je vápník, zinek, draslík a železo, což může vést ke zhoršenému vstřebávání těchto látek či k mechanickému ucpání střev. Zvláště nevýhodná je kombinace nadbytku vlákniny s malým příjmem mléka a mléčných výrobků. Zvýšíme-li konzumaci vlákniny, musíme zvýšit i množství tekutin (25).

2.5.4 MODC – „oxidovaná celulóza“

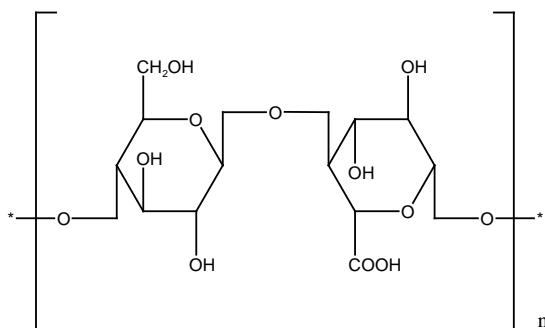
Celulóza je polyanhydroglukóza, tvořená jednotkami β -D-glukopyrynózy vázaných vazbou β -1,4 v přímé řetězce. Jemně rozptýlený, bílý nebo krémově bílý až mírně nažloutlý prášek se slabým zápachem po spálení.

Základem oxidované celulózy je anhydroglukuronová kyselina, která vzniká oxidací primární hydroxylové skupiny vázané na 6. uhlíku β -D-glukopyranózy.

Oxidovaná celulóza může být popsána jako náhodný (statistický) kopolymer, který se skládá s anhydroglukózy a kyseliny anhydroglukuronové obecného vzorce, kde n značí stupeň polymerace, x průměrný stupeň oxidace celulózy $<0,1>$:



Když $x=0$ jedná se o čistou celulózu, $x=1$ jedná se o plně oxidovanou celulózu. $X=0,5$ poměr oxidované k čisté celulóze je 1:1 a můžeme ji označit vzorcem:



Oxidovaná celulóza, sodnovápenatá sůl, je nerozpustná v běžných organických rozpouštědlech a ve zředěných minerálních kyselinách. Je částečně rozpustná ve vodě, rozsah rozpustnosti závisí na stupni polymerizace. Je rozpustná ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a v některých speciálních rozpouštědlech známých jako rozpouštědla celulózy (jako je například Schweizerovo činidlo, roztok amoniakálního oxidu mědi).

2.6 SUPERRODINA IMUNOGLUBILUNU

Obsahuje širokou řadu molekul s opakujícími se Ig doménami. Někteří členové této superrodiny hrají významnou roli v cévních onemocněních. Jedná se o důležité adhezivní molekuly ICAM-1, ICAM-2 (intercellular cell adhesion molekule-1 a 2), VCAM-1 (vascular cell adhesion molekule-1), PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molekule-1) a MAdCAM-1 (mucosal addressin cell adhesive molekule-1) (4).

ICAM-1 je exprimována na mnoha typech buněk, ale u endoteliálních buněk je její exprese regulována. Orgány s relativně vysokou expresí ICAM-1 (plíce), projevují menší zvýšení produktivity v ICAM-1 po stimulaci imunoregulačními látkami v buňkách imunitního systému než ty orgány s nízkou expresí (srdce). Rozpustná isoforma ICAM-1 může být pozorována v normálním séru. Při různých onemocněních dochází k výraznému zvýšení jejich hladiny. ICAM-2 je zkrácená forma ICAM-1, která je v podstatě exprimována na endoteliálních buňkách, ale při aktivaci endotelu nedochází ke zvýšení její hladiny (26).

Exprese VCAM-1 je u klidových endoteliálních buněk zanedbatelná, ale může být výrazně zvýšena po setkání s cytokiny. Tento CAM zprostředkovává adhezi leukocytů a monocytů k aktivovanému endotelu.

PECAM-1 je exprimována zejména na trombocytech, leukocytech a endotelových buňkách. PECAM-1 může zprostředkovat adhezi skrz kterékoliv homogenní, ale i heterogenní interakce. Její exprese zůstává i po stimulaci cytokiny stejná (27).

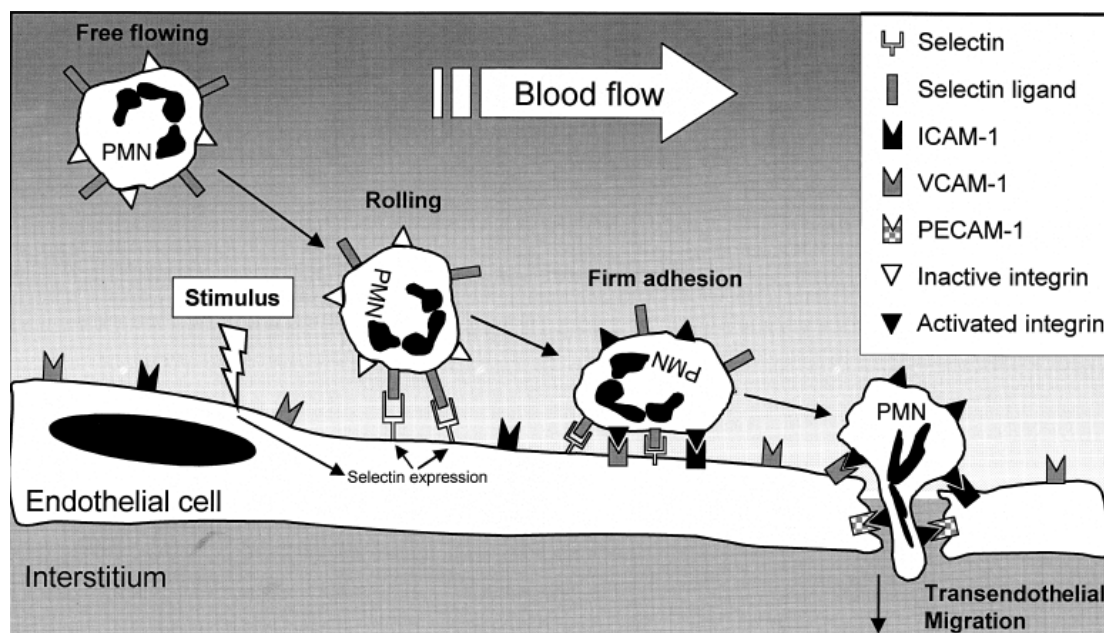
MAdCAM-1 je exprimována ve větší míře na endotelu žilek Peyerových plátů, lymfatických uzlinách embryí, v menší míře na intestinální lamina propria a velmi málo v dutině sleziny.

2.6.1 Fyziologická funkce CAM

Všechny cévy kardiovaskulárního systému (artérie, kapiláry a cévy), mohou exprimovat buněčné adhezivní molekuly. Primárním ložiskem zánětlivé reakce jsou postkapilární venuly, pravděpodobně díky nejvyšší hustotě exprese těchto molekul v tomto cévním segmentu. Výzkumy o chování leukocytů ve venulách in vivo, vedly k vytvoření modelu leukocyto-endotelové buněčné interakce. Tento model popisuje ve

třech následných a koordinovaných krocích migraci leukocytů přes cévní stěnu. Dochází zde k rolování, poté k pevné adhezi a nakonec k transendoteliální migraci (obr. 2) (27).

Obrázek č.2. Schéma migrace leukocytů cévní stěnou



K vybudování adhezivní interakce s endotelovými buňkami, se migrující leukocyty musí přemístit z centrálního proudu směrem k cévní stěně. Selektiny a jejich ligandy zprostředkovávají slabé adhezivní interakce projevující se při rolování. I další buněčné adhezivní molekuly (VCAM-1, MAdCAM-1...) se mohou podílet na krátkodobé vazbě leukocytů, ale jejich působení je slabé. Adherované leukocyty jsou pak vystaveny nízké koncentraci chemoatraktantů, která vede k jejich aktivaci a následně vyvolává na integritu a protilátkách závislou adhezi leukocytů (28).

Aktivace leukocytů je také spojena se zvyšující se aktivitou integrinů, která může být vyvolána chemokiny, bakteriálními peptidy, PAF (faktor aktivující krevní destičky) a leukotrieny (B_4). Transendoteliální migrace leukocytů začíná pohybem adherovaných leukocytů směrem ke spojům endoteliálních buněk. Během tohoto procesu buňka neustále buduje nové adhezivní vazby, stejně tak dochází i k jejich redukci.

2.6.2 Regulace exprese endoteliálních CAM

Přesun leukocytů do místa zánětu je do značné míry řízeno časovým průběhem a velikostí endoteliální exprese CAM. Nejprve dochází k aktivaci L-selektinu na kolujících leukocytech a rychlému pohybu přetvarovanému P-selektinu na povrch endoteliálních buněk. Rolování leukocytů po povrchu endotelu je výsledkem těchto dějů. Aktivací těchto již rolovaných leukocytů nebo expresí β_2 integrinu dochází k vazbě leukocytů na exprimované ICAM-1 na povrchu endotelu. Pro infiltraci velkého počtu leukocytů do zanícené tkáně je důležitá vysoká hustota CAM na endotelu. Počet exprimovaných CAM závisí na jejich syntéze de novo. Na transkripci závislá syntéza endoteliálních CAM (ICAM-1, VCAM-1, MAdCAM-1, E-selektiny, P-selektiny) je vyvolána různými bakteriálními toxiny, cytotoxiny a oxidanty. Maximální exprese těchto CAM nastává za 3 až 6 hodin po počáteční expozici zánětlivým stimulem.

Endoteliální exprese je regulována dvěma transkripčními faktory: NF- κ B a AP-1. Vazebná místa pro NF- κ B byla nalezena v protonové oblasti genů pro L-selektin, VCAM-1 a ICAM-1. Vazebná místa pro AP-1 se nachází v protonové oblasti genů pro ICAM-1 a E-selektiny. Ke zmírnění exprese CAM vyvolané cytokiny, LPS (lipopolysacharidy) nebo oxidanty se používají inhibitory aktivace nebo nukleární translokace faktorů NF- κ B a AP-1 (29).

2.7 PRAŽŠTÍ HEREDITÁLNĚ HYPERTRIGLYCERIDEMIČTÍ POTKANI

Model vývoje a charakterizace

Tito potkani byli vyvinuti jako genetický model lidské hypertriglyceridemie z kolonie potkanů kmene Wistar. Během těchto studií, doktor Antonín Vrána zaznamenal při příjmu vysokého množství karbohydrátů, zvýšený počet metabolických a jiných změn, jež mohou mít patologické následky. Největší význam má hladina plazmatických triglyceridů a tkáňová glukóza. Obměna plazmatických triglyceridů v křížení potkanů kmene Wistar byla dosti široká. Byly vybrány tři páry s nejnižšími a tři z nejvyšších hladin plazmatických triglyceridů pro zkřížení jako bratr x sestra. Výsledky byly porovnány s pevně stanovenými „normotriglyceridemických“ a „hypertriglyceridemických“ hodnotami. Jak bylo demonstrováno, byla hladina

plazmatických triglyceridů více jak čtyřikrát vyšší než v 15. generaci HHTg ve srovnání s normotriglyceridemickými hodnotami. V současnosti jsou HHTg potkani křížení s více než 35 generacemi. Normotriglyceridemická linie byla špatně plodná a začala vymírat. Pro kontrolu jsou ke křížení používáni potkani kmene Wistar s několika charakteristickými vrozenými znaky (uvedeno níže) (30).

Bylo prokázáno, že HHTg potkani trpí hypertenzí. Dále byla u těchto potkanů a potkanů kmene Wistar nalezena pozitivní korelace mezi krevním tlakem a plazmatickou koncentrací triglyceridů (31).

Překvapivě bylo prokázáno, že HHTg potkani nejsou obézní, což naznačuje, že vztah jednotlivých symptomů metabolického syndromu není tak pevný. U HHTg potkanů, ve srovnání a kontrolními potkany, byla prokázána celá řada metabolických poruch včetně inzulínové rezistence (32).

3. PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo ověřit potenciální antidiabetické a protizánětlivé účinky MDOC na experimentálním zvířecím modelu, kterým byl hereditární hypertriglyceridémický potkan (HHTg). K tomu byly sledovány parametry lipidového a glukózového metabolismu v krvi a exprese PECAM-1, VCAM-1 a ICAM-1 v cévním endotelu. K hodnocení morfologických nálezů byly použity imunohistochemické metody.

3.2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.2.1 Zvířata a předepsaná dieta

Samci hereditárního hypertriglyceridémického potkana o váze 200-250 gramů, byli laskavě poskytnuti Ing. L. Kazdovou (IKEM, Praha, Česká Republika) a ustájeni v SEMEDu (Praha, Česká Republika). Všichni potkani staří 2 měsíce byli náhodně rozděleni do 2 skupin (po 6 jedincích).

Kontrolní skupina potkanů byla krmena vysokofruktózovou dietou (standardní laboratorní dieta s přidavkem sacharózy – 70 %) s cílem navodit inzulinovou rezistenci.

U MDOC skupiny zvířata obdržela stejnou dietu s přidavkem 5% MDOC. Potkani v obou skupinách dostávali tuto dietu po dobu 6 týdnů a měly volný přístup k vodě po celou dobu studie. Během experimentu nebyly nalezeny změny tělesné hmotnosti v souvislosti se spotřebou potravy.

Na konci experimentu byla zvířata přes noc vyláčněna a usmrcena dekapitací. Zvířatům byla odebrána krev pro biochemické vyšetření. Dále byly odebrány segmenty ascendentní aorty. Tyto segmenty se ponořily do OCT media (Leica, Praha, Česká republika), následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při – 80°C.

3.2.2 Biochemická analýza

Orální glukózový toleranční test (OGTT) byl prováděn u potkanů po celonočním lačnění. Krev pro stanovení glykémie v průběhu testu byla odebírána z ocasní žíly potkanů v době podání glukózy (3 g/kg tělesné hmotnosti, 30% vodný roztok) intragastrickou sondou a poté po 30, 60 a 120 minutách od doby podání. Pro stanovení glykémie, stejně jako koncentrace sérových triacylglycerolů a cholesterolu, byly použity komerčně dostupné kity (Lachema, Brno, ČR).

3.2.3 Imunohistochemie

Imunohistochemická analýza byla provedena v 1 cm dlouhých segmentech aortálního oblouku, konkrétně z oblasti odstupu truncus brachiocefalicus. Vzorky se ponořily do OCT směsi, následně byly zmrazeny v kapalném dusíku a uloženy v

ledničce při - 80°C. Na zmrazovacím mikrotomu byly poté nakrájeny série příčných řezů o tloušťce (7 um) a ty byly přeneseny na sklíčka předem upravené v roztoku želatiny. Řezy se nechaly oschnout a pak se na 20 minut vložily do roztoku acetonu uchovávaného v - 20°C. Tímto procesem došlo k fixaci řezů a jejich lepší adhezi na podložní sklíčko. Poté se řezy vložily do 0,3% roztoku peroxidu vodíku v PBS (15 minut), čímž se zablokovala endogenní peroxidázová aktivita. Před inkubací řezů s primární protilátkou bylo nutné ještě zablokovat nespecifická vazebná místa, proto se řezy na 30 minut ponořily do roztoku 10% goat séra v PBS (sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo). 1 hodinu se pak inkubovaly s primární protilátkou při pokojové teplotě. Po oplachu v PBS se řezy inkubovaly se sekundární protilátkou – goat anti-mouse Ig konjugovaným na peroxidázou označený polymer (DAKO En Vision+™, Carpinteria, USA). K tomu, aby navázané protilátky mohly být zobrazeny, se použil diaminobenzidin (DAB substrát-chromogen roztok, DAKO, Carpinteria, USA). Pro kontrolní sklíčka byl zvolen stejný postup, ale místo primární protilátky se použil roztok PBS.

Byly použity následující primární protilátky:

- monoklonální protilátka mouse anti-rat CD31 (PECAM-1) – zředění 1/100
- monoklonální protilátka mouse anti-rat CD106 (VCAM-1) – zředění 1/100
- monoklonální protilátka mouse anti-rat CD54 (VCAM-1) – zředění 1/100

Všechny protilátky byly zakoupeny ve firmě BD Pharmingen (California, USA).

Pracovní postup

EnVision systém

1. sušení tkáňových řezů v termostatu (60min)
2. fixace v acetonu (-20°C; 30min)
3. oschnutí řezů (15min)
4. promytí v PBS (2 x 5 min)
5. aplikace 10% blokujícího zvířecího séra (30 min)
6. aplikace primární protilátky (inkubace 60 min)
7. promytí v PBS (2 x 5 min)
8. promytí v 3% H₂O₂ (15 min)
9. promytí v PBS (2 x 5 min)
10. aplikace sekundární protilátky (inkubace 30 min)
11. promytí v PBS (2 x 5 min)
12. inkubace s roztokem chromogenu (DAB) (dobu inkubace různá pro každou protilátku)
13. oplach řezů v acetonu
14. odvodnění řezů (aceton)
15. odvodnění řezů (aceton-xylen 10/1) (3 min)
16. odvodnění řezů (aceton-xylen 1/10) (3 min)
17. odvodnění řezů (xylen) (3 x 2 min)
18. montování řezů do Eukittu

3.2.4 Statistická analýza

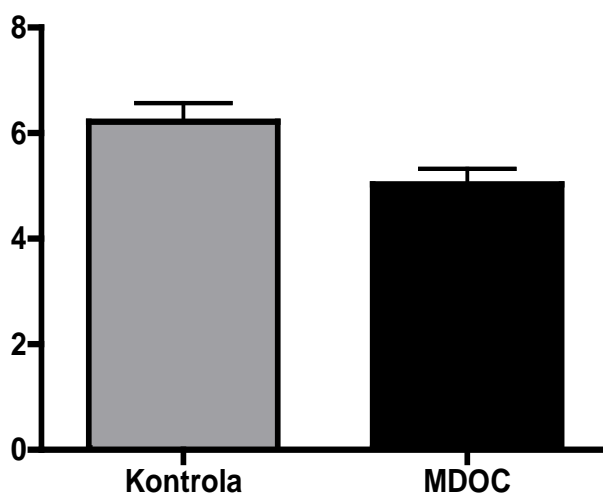
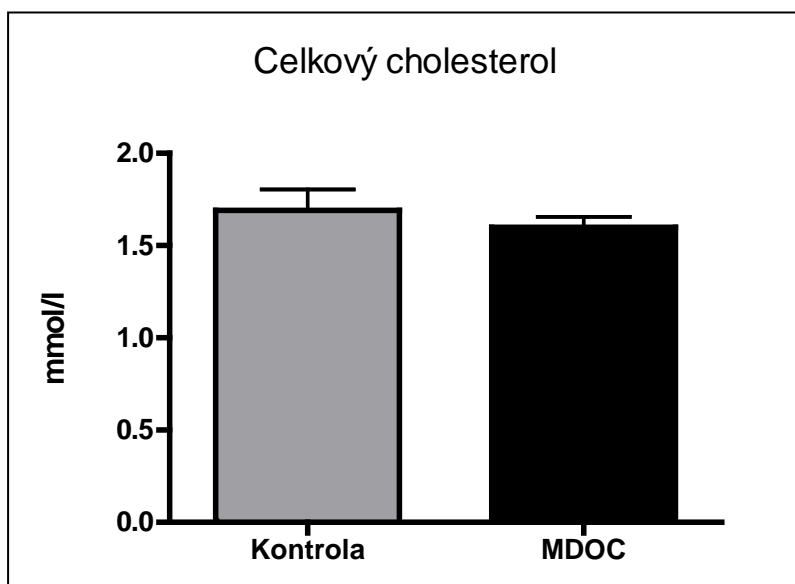
Všechny hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM (střední chyba průměru) pro 6 zvířat v každé skupině. Ke vzájemnému porovnání parametrů u MDOC a kontrolní skupiny byl použit nepárový T test. Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že $p < \alpha$, kde $\alpha=0,05$. K výpočtu byl použit GraphPad Prism software (verze 4.0).

4.VÝSLEDKY

4.1 BIOCHEMICKÁ ANALÝZA

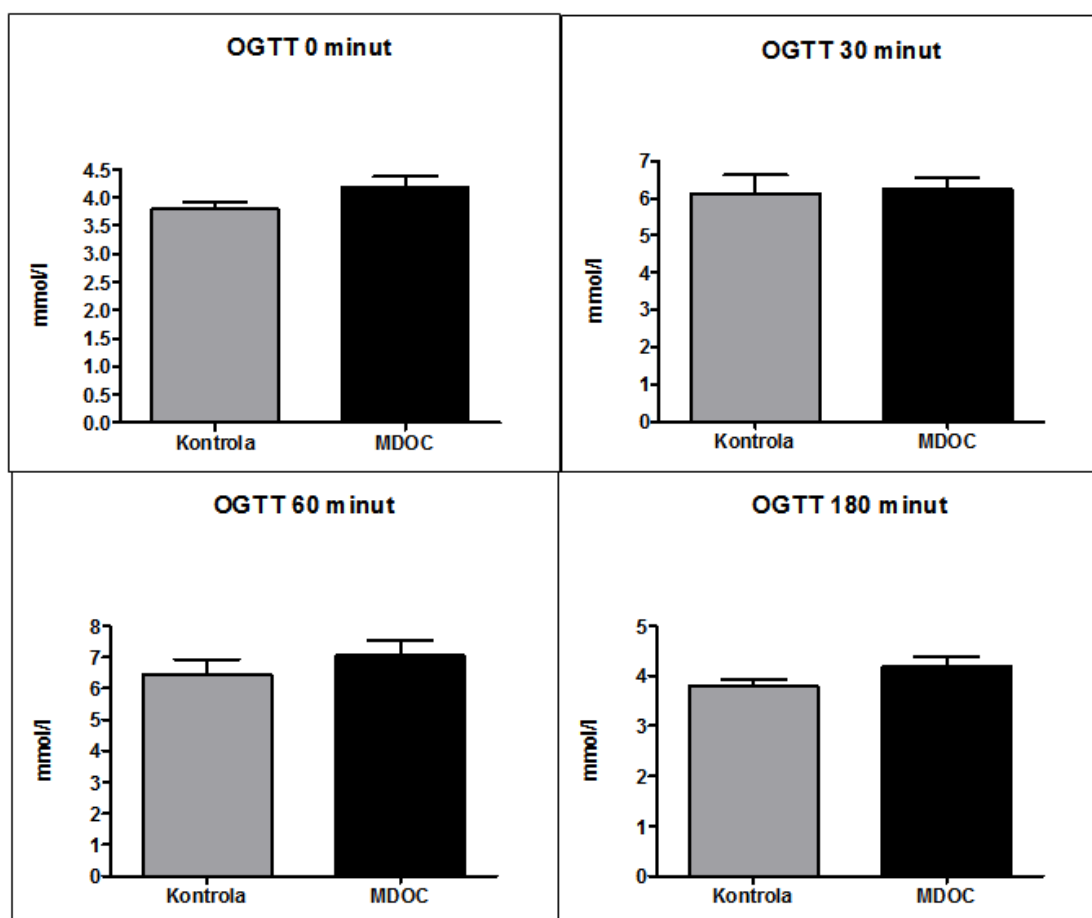
U všech potkanů v experimentu byly stanoveny hladiny celkového cholesterolu a triacylglycerolů (TAG). Výsledky ukázaly, že podávání MDOC neovlivnilo hladiny celkového cholesterolu. Naproti tomu jsme zaznamenali *statisticky významné snížení hladiny TAG cholesterolu* po podávání MDOC v srovnání s kontrolní, neléčenou skupinou (obr. 3).

Obrázek 3. Lipidový profil u kontrolních a MDOC krmených myší. Šestitýdenní podávání MDOC statisticky významně snížilo hladiny TAG ($P \leq 0,05$). Celkový cholesterol nebyl podáváním MDOC ovlivněn.



Za účelem hodnocení parametrů glukózového metabolismu byl zjišťován vliv MDOC na hladiny glukózy. Jako základní test byl zvolen orální glukózový toleranční test. Jak je uvedeno níže MDOC neovlivnilo hladiny glukózy během celého testu (obr.4)

Obrázek 4. Orální glukózový toleranční test. Šestitýdenní podávání MDOC neovlivnilo hladiny glukózy ve srovnání s kontrolní skupinou.



4.2 IMUNOHISTOCHEMICKÁ ANALÝZA

Imunohistochemické barvení PECAM-1, ICAM-1, VCAM-1 v oblasti ascendentní aorty.

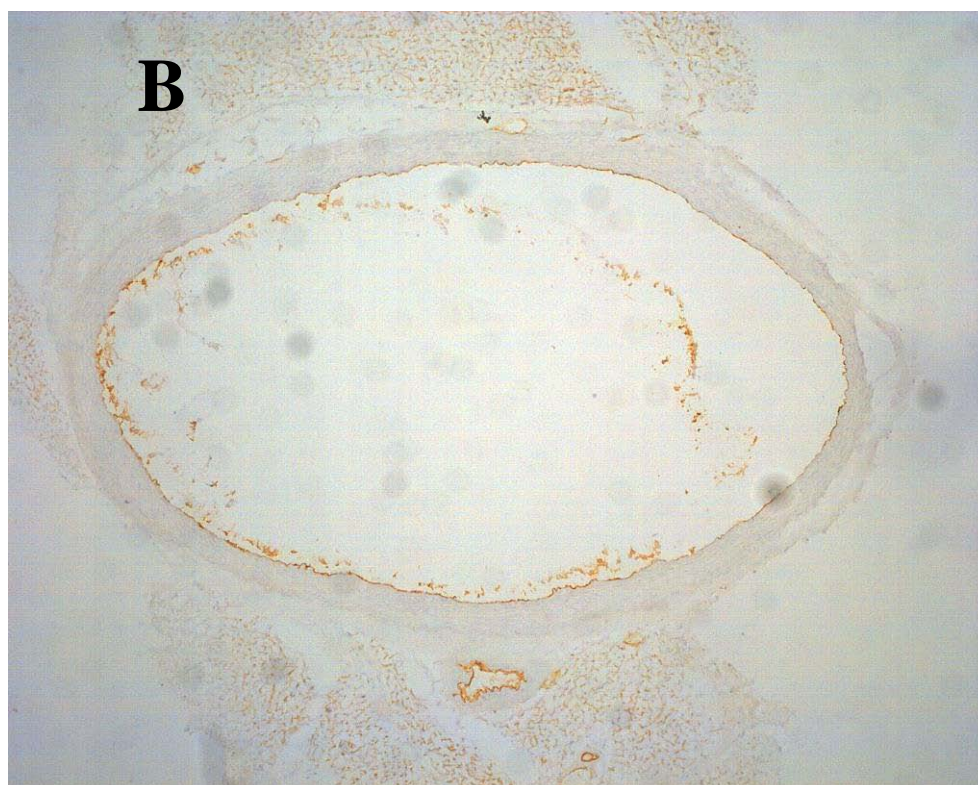
Z hlediska histologického nálezu jsme nepozorovali žádné histologické změny v cévách ani u kontrolní a ani u skupiny léčené MDOC. Žádná indukce aterogenních změn tedy nebyla detekována.

Expresí PECAM-1 byla zjištěna v endotelových buňkách v obou skupinách potkanů. Tato protilátka byla použita jako standard pro detekci intaktního endotelu, protože její exprese by neměla být změněna při změnách hladin cholesterolu (obr. 5).

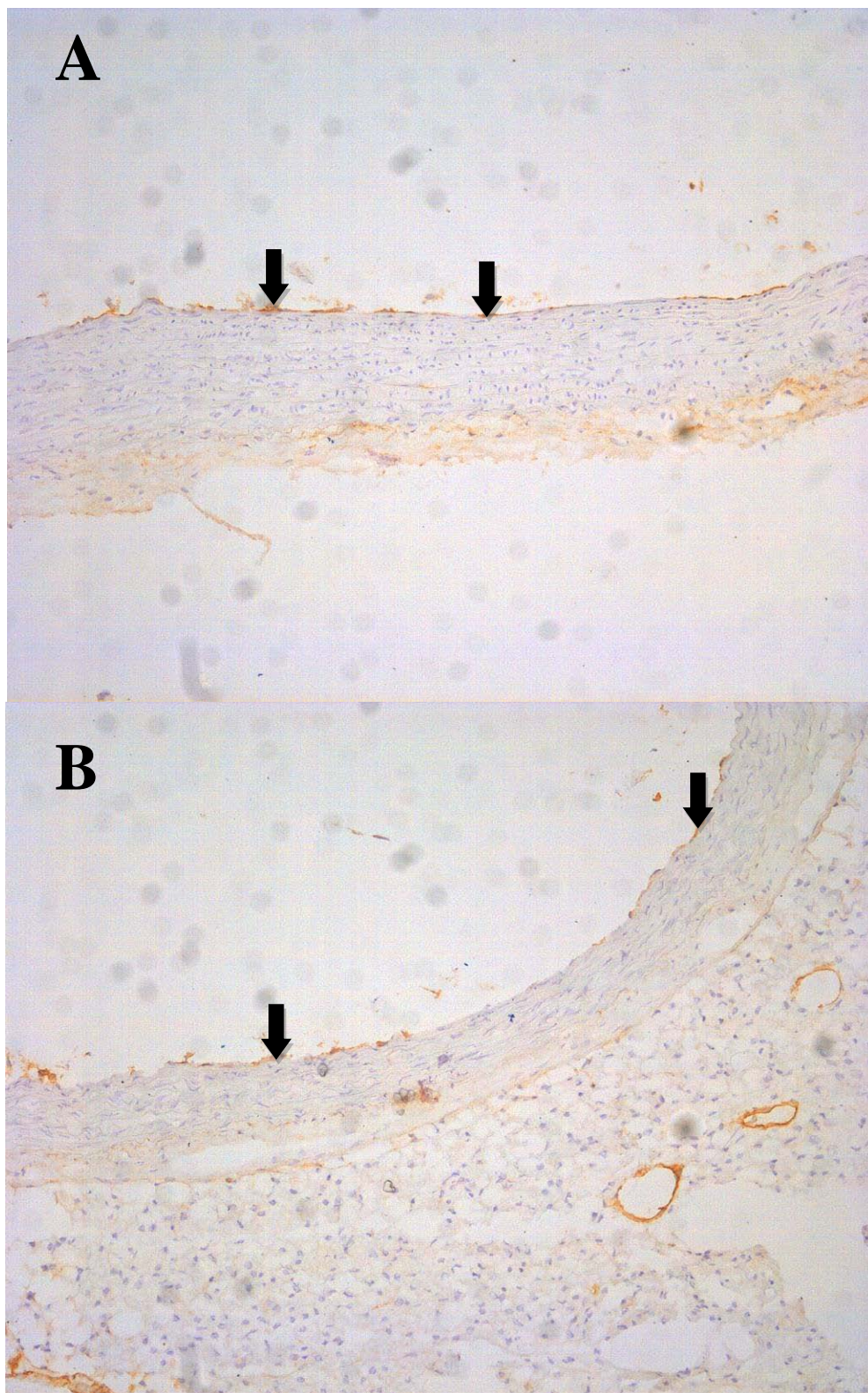
Expresí ICAM-1 byla překvapivě poměrně nízká již u kontrolní skupiny tedy skupiny s prokázanou inzulinovou rezistencí. Velmi podobná exprese byla pozorována také po podávání MDOC (obr. 6).

Naproti tomu jsme nedetkovali žádnou expresi VCAM-1 ani u kontrolní a ani u skupiny léčené MDOC (obr. 7).

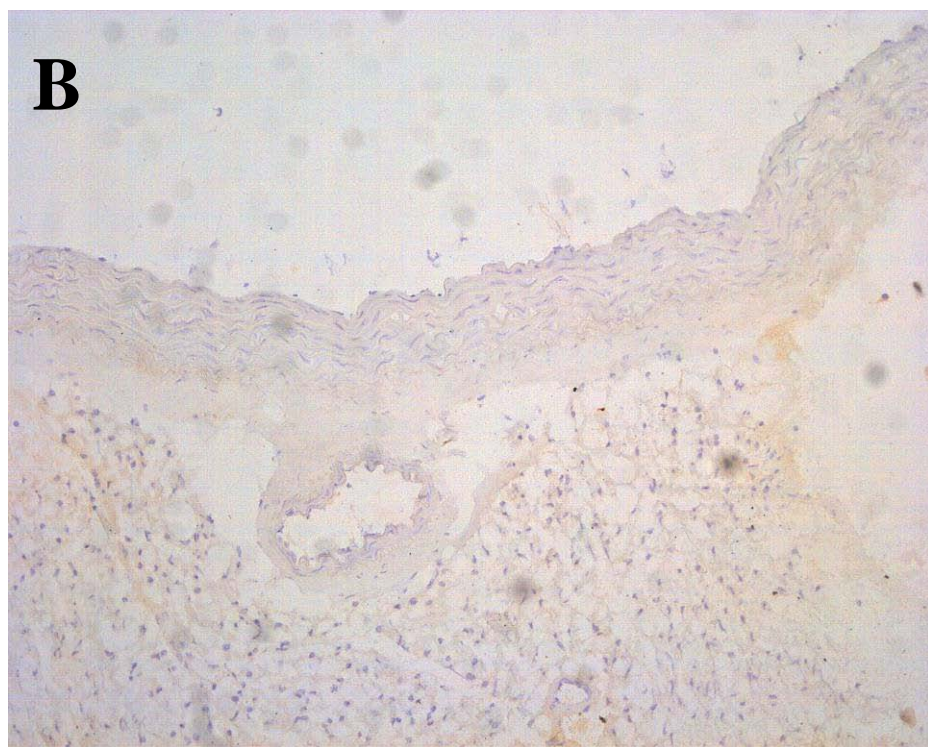
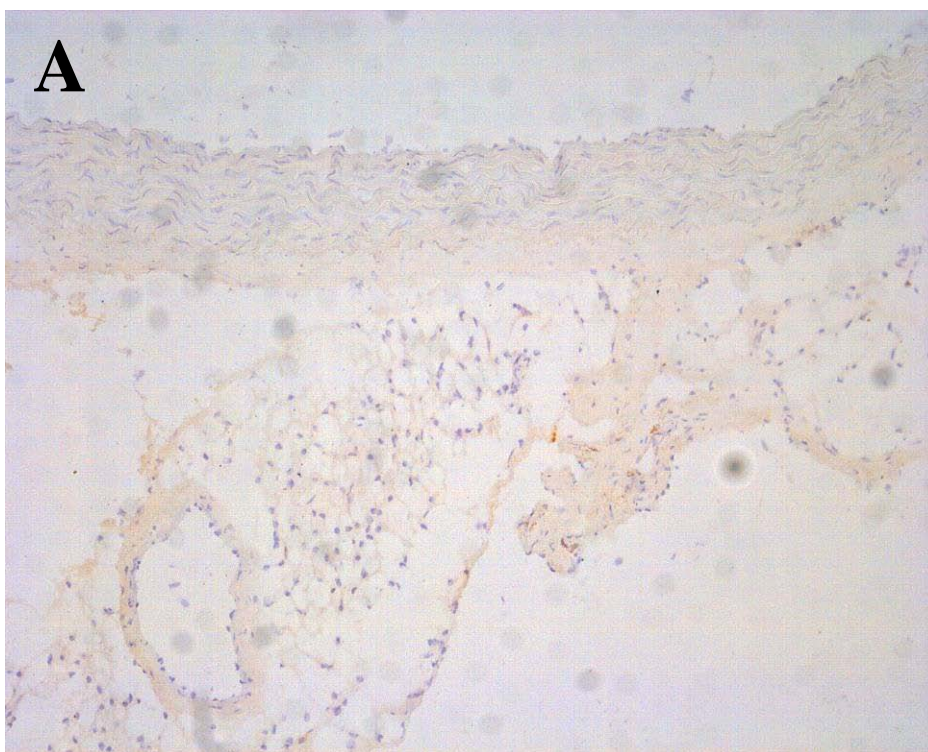
Obrázek 5. *Expresse PECAM-1 na endotelu v oblasti vzestupné aorty u kontrolní (A) a MDOC skupiny (B). Z obrázku je patrná kontinuální pozitivita na celém endotelu, stejná lokalizace a téměř identická intenzita barvení u obou skupin. Zvětšení 40x.*



Obrázek 6 *Expres ICAM-1 na endotelu v oblasti vzestupné aorty u kontrolní (A) a MDOC skupiny (B).* Expres ICAM-1 byla relativně nízká téměř u všech zvířat z obou skupin. Expres byla pozorována pouze v některých místech cévního endotelu aorty (viz šipky). Dále bylo patrné, že podávání MDOC nijak neovlivnilo expresi ICAM-1 (B) Zvětšení 100x.



Obrázek 7. *Expres VCAM-1 na endotelu v oblasti vzestupné aorty u kontrolní (A) a MDOC skupiny (B). Imunohistochemická detekce neprokázala VCAM-1 expresi ani u kontrolní ani u MDOC léčené skupiny. Zvětšení 100x.*



5. DISKUZE

Diabetes mellitus je doživotní, avšak léčitelná choroba. Je to chronické etiopatogeneticky heterogenní onemocnění, jehož společným rysem je hyperglykémie a které má různé klinické formy. Každá z nich má rozdílnou etiologii, klinické projevy a průběh. Společná je komplexní porucha metabolismu s hyperglykemií (14).

U většiny diabetiků se setkáváme s řadou komplikací, které jsou pro pacient velmi nebezpečné. Tyto komplikace dělíme na akutní a chronické. První skupina zahrnuje hypoglykemické stavy a hyperglykemické kóma, do druhé pak řadíme postižení cév, mikroangiopatie a makroangiopatie, vedoucí k postižení tkání a orgánovému selhání.

V terapii diabetu jsou dnes asi nejvýznamnějšími léky *statiny* a *fibráty*, které pozitivně ovlivňují diabetickou dyslipoproteinémii (33).

Nicméně bylo také prokázáno, že podávání *dietní vlákniny* má pozitivní vliv na kardiovaskulární systém a to včetně hladiny cholesterolu.(34) Dietní vláknina je tvořena požitelnou částí rostlinných nebo obdobných sacharidů, které jsou rezistentní trávení a absorpci v lidském tenkém střevě s kompletní nebo částečnou fermentací v tlustém střevě. Dietní vláknina se vyskytuje v zelenině, ovoci, obilninách a dřevě(35). Vlákninu můžeme rozdělit na nestravitelné oligosacharidy (inulin), trávení rezistentní škrob, nerozpustnou dietní vlákninu (celulóza, beta-glukany), a rozpustnou dietní vlákninu (pektin). Vláknina vykazuje řadu pozitivních účinků, ke kterým patří pozitivní vliv na trávicí procesy, např. urychlí střevní pasáž, pozitivně podporuje peristaltiku, absorbuje vodu, změkčí stolici, působí prevenci divertiklů a zácpy, podílí se na absorpci toxických látek. Mezi velmi důležité účinky patří také vliv na metabolismus živin. Rozpustná dietní vláknina se podílí na snížení resorpce tuků, snížení zpětné resorpce žlučových kyselin, snížení energetického obsahu diety, zpomalení resorpce sacharidů, snížení glykémie a insulinémie, potlačení syntézy cholesterolu v játrech zvýšením přívodu kyseliny propionové portálním oběhem do jater (36).

MDOC tedy modifikovaná oxidovaná celulóza je chemicky de facto polyanhydroglukuronová kyselina. Svými vlastnostmi se pravděpodobně může řadit mezi rozpustnou vlákninu.

Tato diplomová práce byla tedy zaměřena na sledování účinků MDOC, podávané hereditárním hypertriglyceridemickým potkanům, které slouží jako model inzulinové rezistenci a diabetu mellitu (31). Tito potkani mají vyšší hladiny TAG a

potvrzený rozvoj inzulínové rezistence, která je potencována vysokofruktózovou dietou (32). Výsledky ukázaly, že podávání MDOC vedlo ke snížení hladiny triacylglycerolů v krvi, nicméně celkový cholesterol nebyl MDO ovlivněn. Tento jev poukazuje na fakt, že nízké hladiny cholesterolu, které jsou typické pro tento kmen potkanů nemohou být ještě dále nijak výrazně ještě sníženy. Naproti tomu snížení hladin TAG v krvi je rozhodně pozitivní efekt MDOC. TAG jsou u těchto potkanů výrazně zvýšeny, zejména po podávané vysokofruktóзовé dietě. V této chvíli ovšem nejsme schopni objasnit mechanismus tohoto efektu MDOC. Parametry glukózového metabolismu, reprezentované orálním glukózovým tolerančním testem nebyly podáváním MDOC ovlivněny

Ig skupina adhezivních molekul je rozsáhlá rodina povrchových buněčných molekul, která představuje 50% všech povrchových molekul leukocytů. Jde o látky glykoproteinového charakteru tvořené opakujícími se Ig doménami z beta řetězců (4).

Zprostředkovávají jak homofilní (vazba adhezivní molekuly v jedné buňce na stejnou molekulu ve druhé), tak heterofilní interakce (vazba adhezivní molekuly v jedné buňce na neidentickou molekulu ve druhé buňce).i Patří zde celá řada adhezivních molekul jako antigenně specifické receptory T a B lymfocytů TCR, BCR, koreceptory T lymfocytů CD4 a CD8, které jsou důležité pro jejich správnou funkci při imunitních reakcích.

Z hlediska vztahu k diabetu mellitu a endoteliální dysfunkci jsou nejvýznamnějšími zástupci vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) a platelet cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) (37).

PECAM-1 slouží zejména jako marker přítomnosti endotelu a jeho exprese se během rozvoje endoteliální dysfunkce nijak zásadně nemění což se také ukázalo v této diplomové práci, kde byla jeho exprese stejně výrazná v obou experimentálních skupinách. Rozvoj endoteliální dysfunkce, který se objevuje v iniciačních stádiích aterosklerózy ale i diabetu mellitu je charakterizován zvýšenou expresí cytoadhezivních molekul jako je ICAM-1 a VCAM-1 (38).

V této diplomové práci však bylo překvapivě zjištěno, že exprese obou markerů, tedy ICAM-1 a VCAM-1 je nízká již u neléčených HHTg potkanů, přičemž VCAM-1 nebyl dokonce experimentován cévním endotelem aorty vůbec. Podávání MDOC zjevně

neovlivnilo expresi obou těchto markerů. Výsledky této diplomové práce tedy ukázaly, že hereditární hypertriglyceridemičtí potkani neukazují významný rozvoj endoteliální dysfunkce, který bývá často charakterizována zvýšenou expresí adhezních molekul. Podávání MDOC snížilo hladiny TAG, tento jev nijak neovlivnil expresi studovaných adhezních molekul.

6. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo ověřit potenciální antidiabetické a protizánětlivé účinky MDOC na experimentálním zvířecím modelu, kterým byl hereditární hypertriglyceridémický potkan (HHTg).

Výsledky biochemické analýzy prokázaly pozitivní vliv podávané MDOC na hladiny TAG.

Hladiny celkového cholesterolu a glukózy nebyly podáváním MDO ovlivněny.

Expresí adhezních molekul ICAM-1 a VCAM-1, které reflektují rozvoj endoteliální byla překvapivě velmi slabá již u neléčených HHTg potkanů.

Podávání MDOC navíc nijak tuto expresi neovlivnilo.

Závěrem lze tedy konstatovat, že jsme neprokázali antidiabetické a protizánětlivé účinky u HHTg potkanů coby modelu diabetu mellitu typu II.

Navíc lze také konstatovat, že použitý model není ani vhodný pro studium změn exprese některých markerů endoteliální dysfunkce, z důvodu velmi slabé exprese těchto markerů na cévním endotelu HHTg potkanů.

7. LITERATURA

1. Solanes N, Rigol M, Ramirez J, Segales J, Roque M, Marimon JM, Perez-Villa F, Roig E, Sanz G and Heras M: Histological basis of the porcine femoral artery for vascular research. *Anat Histol Embryol* 34: 105-11, 2005.
2. Vanhoutte PM: [Endothelial dysfunction and atherosclerosis]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 90 Spec No 6: 9-19, 1997.
3. Davignon J and Ganz P: Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 109: III27-32, 2004.
4. Krieglstein CF and Granger DN: Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens* 14: 44S-54S, 2001.
5. Najemnik C, Sinzinger H and Kritz H: Endothelial dysfunction, atherosclerosis and diabetes. *Acta Med Austriaca* 26: 148-53, 1999.
6. van Haelst PL, van Doormaal JJ, Asselbergs FW, van Roon AM, Veeger NJ, Henneman MM, Smit AJ, Cohen Tervaert JW, May JF and Gans RO: Correlates of endothelial function and their relationship with inflammation in patients with familial hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)* 104: 627-32, 2003.
7. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM and Stern DM: Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91: 3527-61, 1998.
8. Gryglewski RJ: Interactions between endothelial mediators. *Pharmacol Toxicol* 77: 1-9, 1995.
9. Faggitotto A and Paoletti R: Do pleiotropic effects of statins beyond lipid alterations exist in vivo? What are they and how do they differ between statins? *Curr Atheroscler Rep* 2: 20-5, 2000.
10. Toborek M and Kaiser S: Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol* 94: 295-314, 1999.
11. Hotta Y, Otsuka-Murakami H, Fujita M, Nakagawa J, Yajima M, Liu W, Ishikawa N, Kawai N, Masumizu T and Kohno M: Protective role of nitric oxide synthase against ischemia-reperfusion injury in guinea pig myocardial mitochondria. *Eur J Pharmacol* 380: 37-48, 1999.
12. Rubanyi GM, Freay AD, Kauser K, Sukovich D, Burton G, Lubahn DB, Couse JF, Curtis SW and Korach KS: Vascular estrogen receptors and endothelium-derived nitric oxide production in the mouse aorta. Gender difference and effect of estrogen receptor gene disruption. *J Clin Invest* 99: 2429-37, 1997.

13. Taylor AL: Endothelial dysfunction and nitric oxide enhancing therapy: a new approach to the treatment of heart failure. *Congest Heart Fail* 10: 237-42, 2004.
14. Bonnefont-Rousselot D, Beaudoux JL, Therond P, Peynet J, Legrand A and Delattre J: [Diabetes mellitus, oxidative stress and advanced glycation endproducts]. *Ann Pharm Fr* 62: 147-57, 2004.
15. Petersen KF and Shulman GI: Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 90: 11G-18G, 2002.
16. Shantaram V: Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes and hypertension. *Clin Exp Hypertens* 21: 69-77, 1999.
17. Jones PH: Clinical significance of recent lipid trials on reducing risk in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 99: 133B-140B, 2007.
18. Yan SF, Ramasamy R, Naka Y and Schmidt AM: Glycation, inflammation, and RAGE: a scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circ Res* 93: 1159-69, 2003.
19. Semenkovich CF and Heinecke JW: The mystery of diabetes and atherosclerosis: time for a new plot. *Diabetes* 46: 327-34, 1997.
20. McGarry JD: Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 51: 7-18, 2002.
21. D'Agostino RB, Jr., Hamman RF, Karter AJ, Mykkanen L, Wagenknecht LE and Haffner SM: Cardiovascular disease risk factors predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes Care* 27: 2234-40, 2004.
22. Chaplin MF: Fibre and water binding. *Proc Nutr Soc* 62: 223-7, 2003.
23. Dikeman CL and Fahey GC: Viscosity as related to dietary fiber: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 46: 649-63, 2006.
24. Levrat MA, Favier ML, Moundras C, Remesy C, Demigne C and Morand C: Role of dietary propionic acid and bile acid excretion in the hypocholesterolemic effects of oligosaccharides in rats. *J Nutr* 124: 531-8, 1994.
25. Nishina PM and Freedland RA: The effects of dietary fiber feeding on cholesterol metabolism in rats. *J Nutr* 120: 800-5, 1990.
26. Moiseeva EP: Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc Res* 52: 372-86, 2001.
27. Joseph-Silverstein J and Silverstein RL: Cell adhesion molecules: an overview. *Cancer Invest* 16: 176-82, 1998.

28. Mareckova Z, Heller S and Horky K: [Cell adhesion molecules and their role in pathophysiologic processes]. *Vnitr Lek* 45: 46-50, 1999.
 29. Ross R: Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115-26, 1999.
 30. Vrana A and Kazdova L: The hereditary hypertriglyceridemic nonobese rat: an experimental model of human hypertriglyceridemia. *Transplant Proc* 22: 2579, 1990.
 31. Zourek M, Kyselova P, Mudra J, Krcma M, Jankovec Z, Lacigova S, Visek J and Rusavy Z: The relationship between glycemia, insulin and oxidative stress in hereditary hypertriglyceridemic rat. *Physiol Res*: 2007.
 32. Zicha J, Pechanova O, Cacanyiova S, Cebova M, Kristek F, Torok J, Simko F, Dobesova Z and Kunes J: Hereditary hypertriglyceridemic rat: a suitable model of cardiovascular disease and metabolic syndrome? *Physiol Res* 55 Suppl 1: S49-63, 2006.
 33. Duriez P: [Mechanisms of actions of statins and fibrates]. *Therapie* 58: 5-14, 2003.
 34. Ryzhenkov VE, Remezova OV and Beliakov NA: [Dietary fiber and synthetic nonspecific enterosorbents: their hypolipidemic and anti-arteriosclerotic effects]. *Vopr Pitan*: 11-8, 1991.
 35. Campbell AP: Health benefits of dietary fiber for people with diabetes. *Diabetes Educ* 27: 511-4, 2001.
 36. Bennett WG and Cerda JJ: Benefits of dietary fiber. Myth or medicine? *Postgrad Med* 99: 153-6, 166-8, 171-2 passim, 1996.
 37. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW and Milstone DS: A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 107: 1255-62, 2001.
 38. Rosenblum WI, Nelson GH, Wormley B, Werner P, Wang J and Shih CC: Role of platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM) in platelet adhesion/aggregation over injured but not denuded endothelium in vivo and ex vivo. *Stroke* 27: 709-11, 1996.
-